

三重県有用微生物ライブラリーの構築に向けた微生物資源の探索

—酵母及び乳酸菌の単離，同定及び特性解析—

伊藤太一^{*}，丸山裕慎^{*}，長谷川圭司^{*}

Exploration of Microbial Resources for the Establishment of a Mie Microbial Resource Collection
- Isolation, Identification, and Characterization of Yeasts and Lactic Acid Bacteria -

Daichi ITO, Hironori MARUYAMA and Keishi HASEGAWA

Microorganisms inhabiting natural environments are valuable resources for fermented foods and foods with functional claims. In this study, yeasts and lactic acid bacteria were isolated from 12 sites across Mie Prefecture, and their characteristics and potential applications were evaluated. Among 54 yeast isolates, three were identified as *Saccharomyces cerevisiae*. Strains C21a and S30 showed fermentation performance comparable to MK1, one of the Mie sake yeast strains, whereas strain N19 exhibited lower fermentative capacity. Among 46 lactic acid bacteria isolates, strains N23 and C50 showed high coagulation ability in litmus milk and strong lactic acid production. Additionally, strains K10 and S24 exhibited high γ -aminobutyric acid (GABA) production. These results suggest that microorganisms isolated in this study have potential for applications in the food industry.

Keywords: Microbial Library, Yeast, Lactic acid Bacteria, Fermented Foods, Functional Foods

1. はじめに

三重県は、平野部や沿岸部にみられる温暖な気候に加え、伊賀地域の盆地特有の寒暖差の大きい気候、さらに南部における高温多雨の気候など、多様な気候的、地理的特徴を有する。このような環境条件の違いは、そこに生息する微生物の分布などに影響を与えると考えられており、三重県においても地域ごとに異なる微生物分布が存在している可能性がある¹⁾。このような微生物の多様性は、農業、医療および食品製造などさまざまな分野で利用される有用資源の供給源となる。これらを探索、単離、および特性解析をするとともに、微生物ライブラリーとして体系的に収集および保存することは、微生物資源の有効利用に向けて重要である²⁾。しかしながら三重県においては、県

内全域を対象とした体系的な微生物調査はほとんど行われておらず、実際にどの程度の多様性が存在するのかは十分に明らかになっていない。

一方で、微生物は発酵食品の製造において重要な役割を担っており、自然環境から単離された微生物を活用することは、新たな食品開発や地域ブランドの創出につながる可能性があり、他地域では有用微生物のライブラリー化やその分譲体制の整備が進められている³⁻⁵⁾。これまでも県内では、ビール醸造用酵母や生地発酵に適した酵母の単離が報告されているが、これらは個別的な事例にとどまっている^{6,7)}。また、三重県工業研究所においては清酒やビール用の酵母が分譲されているものの、より幅広い食品用途を想定した微生物資源の蓄積はされておらず、地域ブランドの創出の点からも有用微生物のライブラリー化は必要であると考えられる。

^{*} 食と医薬品研究課

そこで本研究では、三重県内の多様な環境から微生物の単離を試み、その分布の特徴を把握するとともに、主に酵母および乳酸菌を対象として生理学的特性の評価を行うこととした。さらに、得られた微生物を整理、保存し、有用微生物ライブラリーの構築に向けた基盤づくりを行うことを目的とする。また、本研究を通して、三重県における微生物多様性の実態の一端を明らかにするとともに、食品分野への応用可能性について検討する。

2. 実験方法

2.1 使用した試薬及び培地

酵母の培養には、YPD 培地 (Yeast extract (Solabia Biokar Diagnostics 社) 1 % (w/v), Poly Pepton (ナカライテスク株式会社) 2 (w/v) %, D-(+)-グルコース (ナカライテスク株式会社) 2 (w/v) %), 乳酸菌の培養には MRS 培地 (Becton, Dickinson and Company) を使用した。平板培地の場合は、アガロースの濃度は 1.5 (w/v) % とした。凝乳試験にはスキムミルク培地 (スキムミルク 10 % (w/v), リトマス液 1 % (v/v)) を使用した⁸⁾。リトマス液は、粉末のリトマス (5 % (w/v)) を熱水に浸漬し濾過して作製した。γ-グルタミルアミノ酪酸 (以下、GABA) 生成用液体培地は、MRS 培地に L(+)-グルタミン酸ナトリウム 1 水和物を 1 % (w/v) となるように添加した⁹⁾。他記載のないものは富士フィルム和光純薬株式会社製を使用した。

2.2 微生物の単離と同定

2.2.1 環境サンプルの採取及び単離

三重県内の北勢、中南勢、伊勢志摩、伊賀、東紀州の 5 つの地域の 12 地点で環境サンプルの採取を行った (図 1)。酵母を対象にした集積培養には YPD 培地 (クロラムフェニコール 100 ppm 添加) を、乳酸菌を対象にした集積培養には MRS 培地を用いた。各培地を 40 mL ずつ分注した 50 mL 容遠沈管に環境サンプルを浸漬した¹⁰⁾。植物サンプルはピンセットで、土壌サンプルは 10 g 程度を葉さじで採取した。果実、稚魚サンプルは、遠沈管に収容可能な寸法に切断して浸漬した。海水サンプルは滅菌濾紙で濾過し、濾過後の濾紙を集積培地に浸漬して集積培養を行った¹¹⁾。集積培養は 30 °C で 3 日間行い、菌体が増殖した培養液を再度、集積培地で 30 °C で 3 日間培養した。その後、培養液を適宜希釈して平板培地に塗布して 30 °C

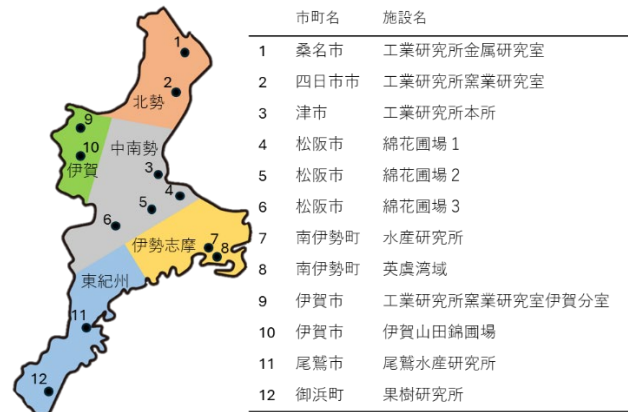


図 1 環境サンプル採取地。

で培養し、形成したコロニーを白金耳で平板培地に画線し、30 °C で培養して単一のコロニーとなるようにした。乳酸菌を対象にした単離には炭酸カルシウム (1 (w/v) %) を添加した MRS 平板培地をシャーレ上で希釈培養液と混合した。培養は 5.0 % の CO₂ 濃度で行った。その後コロニーに形成したハローを確認した。得られたコロニーを各液体培地で培養し、培養液をグリセロール終濃度 10 % に調製して -80 °C で保存し、グリセロールストックとした。

2.2.2 単離した微生物の同定

YPD 平板培地の単一のコロニーを白金耳で 180 μL の 50 mM 水酸化ナトリウム溶液に懸濁して、95 °C、10 分間加熱した後、20 μL の 1 M の Tris-HCl (pH 8.0) を加えて攪拌し、遠心分離 (15,000 rpm, 10 min, 4 °C) した上清を DNA 抽出液とした。酵母の同定には、D1/D2 領域の配列を、乳酸菌の同定には 16S リボソーム領域の配列を使用した。D1/D2 領域の配列の増幅には、NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') と NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') を、16S リボソーム領域の配列の増幅には、27F (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') と 1492R (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') をプライマーに用いた。PCR 用酵素は KOD ONE (東洋紡株式会社) を用い、PCR の条件は、KOD ONE のプロトコルに従い決定した。PCR 後の反応液は、Exo SAP-IT (Applied Bioscience 社製) を用いて精製した。塩基配列の解析は、三重大学先端科学研究支援センター遺伝子実験施設、大量 DNA シーケンストータルサービスに依頼した。D1/D2 の部分塩基配

列は、プライマーの NL-1 と NL-4 を用いて、16SrDNA の部分塩基配列は、27F と 518R (5'-ATTACC-GCGGCTGCTGG-3') のプライマーを用いて決定し、得られた塩基配列を BLAST プログラムにより相同性検索して、菌種の同定を行った⁹⁾。

2.3 単離した酵母の醸造特性の評価

2.3.1 生理学的特性の評価

各実験の前培養は、グリセロールストックから YPD 液体培地に植菌し、30℃で2日間培養した。産膜性の有無は、YPD 液体培地の液面に形成した膜を確認した。TTC 染色法では、前培養液を TTC 下層培地にスポットして 30℃で2日間培養後、コロニーが形成された下層培地に TTC 上層培地を重層して呈色を観察した¹²⁾。対照としてきょうかい酵母 K701 株を使用した。キラー性は、前培養液ときょうかい酵母 K701 株の培養液を白金耳で十字に交差させて YPD 平板培地に線画し、30℃で2日間培養し、形成したコロニーから判断した³⁾。炭酸ガス生成試験は、ダーラム管を入れた YPD 液体培地に前培養液を接種後、30℃で2日間培養し、炭酸ガスの生成をダーラム管中の気泡で確認した。糖資化試験は酵母同定用検査キット API 20C AUX (Biomérieux Japan 株式会社)を用いた。糖耐性はグルコース濃度を 5%、10%、アルコール耐性はエタノール濃度を 5%、10%に調製した YPD 液体培地に前培養液を接種後、30℃で2日間培養し増殖の有無で確認した。

2.3.2 清酒小仕込み試験

小仕込み試験には、対象として三重県清酒酵母 MK1 および単離した N19 株、C21a 株および S30 株を用いた。仕込み配合は、乾燥麹 (G - 50, 徳島製麹株式会社) 19.2 g, 乾燥 α 化米 (AA - 60, 徳島製麹株式会社) 72.8 g, 仕込み水 170 mL, 酵母培養液 4 mL の総米 100g の一段仕込みとした¹³⁾。仕込み水には予め 90%乳酸を 575 μ L/L 添加したものを使用し、酵母培養液は 7.5×10^7 cell/mL となるよう調製した。醪は 15℃で経過させ、発酵中は炭酸ガスの揮散に伴う醪重量の減少を秤量し、25 日目に発酵を終了した。上槽は遠心分離 (5000 rpm, 10 min, 4℃) で行い、上清をその後の分析に供した。日本酒度、アルコール度数、酸度、アミノ酸度および香气成分分析は国税庁所定分析法に基づき実施した¹⁴⁾。グルコース濃度は高速液体

クロマトグラフ (HPLC ; Alliance 2695, Waters Corp.) で測定した。移動相として硫酸 (1 mM) を 1 mL/min で通液し、60℃のカラム (RezoxROA-organic acid H+ (8%), Phenomenex Inc.) で分離後、示差屈折率計で検出した (40℃)。有機酸濃度の測定は、移動相として過塩素酸水溶液 (3 mM) を 1 mL/min で通液し、60℃のカラム (Shodex KC-811 $\times$ 2 本, 昭和電工株式会社) で分離後、ポストカラム法にて BTB 溶液 (0.2 mM) を含むリン酸水素 2 ナトリウム水溶液 (15 mM) と等量混合し、450 nm の吸光度をフォトダイオードアレイ検出器で検出した。各測定は 3 回の独立試験で行い、データは一元配置分散分析を用いて解析し、有意差が認められた場合には、有意水準は $p < 0.05$ で Tukey の HSD 検定を行った。

2.4 乳酸菌のスキムミルク凝乳試験、乳酸生成測定及び GABA 生成測定

単離した乳酸菌の生理学的性質を観察には、スキムミルク凝乳試験、乳酸生成量の測定および GABA 生成量の測定を実施した。各実験の前培養は、グリセロールストックから MRS 液体培地に植菌し、30℃で1日間培養した。各実験は 3 回の独立試験で行い、有意差の検定は、2.3.2 と同様に行った。スキムミルク凝乳試験は、前培養液をスキムミルク培地に接種して、30℃で48時間培養した。リトマスの呈色を目視で確認し、pH と酸度は自動滴定装置値を使用し測定した。酸度は、試料 10.0g を秤量し、蒸留水 40 mL を加え、0.1 M NaOH を滴下し pH が 8.4 になるまでに要した液量から算出した⁸⁾。乳酸生成量は乳酸測定キット (同仁化学株式会社) を用い、実験は製品のプロトコルに従った。GABA 生成は、前培養液を GABA 生成用液体培地に接種して、30℃で48時間培養を行った。GABA 生成量の測定は、GABA 測定キット (バイオセンサ株式会社) を用い、反応液の 555 nm における吸光度を測定した。

3. 実験結果及び考察

3.1 微生物の単離と同定

3.1.1 環境サンプルの採取及び単離

環境サンプルとして、北勢地域から 50 サンプル、中南勢から 69 サンプル、伊勢志摩地域から 38 サンプル、伊賀地域から 27 サンプル、東紀州地域から 56 サンプル、全体で 240 サンプルを採取し

た(図1)．環境サンプルには、植物サンプルとして桜、綿花等の花卉や、みかん、ビワ等の果実を、海洋サンプルとして海水、養殖稚魚等を使用した．集積培養と、平板培地による2回の単離を経て、酵母を対象にした単離では54株、乳酸菌を対象にした単離では46株を単離し、各菌株のグリセロールストックを作成した．

3.1.2 菌株の同定

同定の結果、酵母では *Candida* 属、乳酸菌では *Staphylococcus* 属などの病原性が疑われる菌株も見られたが、一般的に酒類や発酵食品に用いられるもの多数あった．酵母では、*Saccharomyces cerevisiae*、ビールやワインの発酵に使用される *Hanseniaspora* 属と *Pichia* 属、また油脂生産能のある *Rhodotorula* 属などの54株が同定された．*S. cerevisiae* と同定した3株は、北勢地域の花弁由来のN19株、中南勢地域の果実由来のC21a株、伊勢志摩地域の海水由来のS30株とした．単離した乳酸菌の中には、ヨーグルトなどの乳製品の発酵に用いられる *Lactococcus lactis*、植物性乳酸菌として知られる *Leuconostoc mesenteroides* や *Lactiplantibacillus plantarum*、また整腸効果があるとして整腸剤に利用されている *Enterococcus* 属などの44株が同定された¹⁵⁾．

3.2 単離した酵母の醸造特性の評価

3.2.1 産膜性、TTC 染色性、キラー性及び炭酸ガス生成能の観察

単離した酵母の生理学的性質として産膜性、TTC 染色性、キラー性、および炭酸ガス生成能を観察した．

単離した54株のうち22株が産膜性を示した．産膜性酵母は液面に膜を形成し、香味の変化や濁りを引き起こすことが知られており、清酒やビールの製造においては汚染微生物として位置付けられる．したがって、これら22株は酒類製造への利用には適さない可能性が高いと考えられた．

TTC 染色の結果、単離した54株のうち17株が赤色に呈色した．TTC 染色は代謝活性の高い酵母の選抜法の一つとして用いられ、きょうかい酵母などの清酒酵母は赤色に染色されることが知られている¹²⁾．したがって、今回赤色に呈色を示した17株は、きょうかい酵母と同程度の代謝活性を有する可能性が示唆された．

キラー性の試験では、抗菌活性を示すハローを形成した株はなく、キラー性を示す株はなかった．キラー性とは、別種の酵母を死滅させる可能性がある酵母の性質であり、本来使用する酵母の生育が抑えられ、食品の品質や安全性に対して問題が

表1 糖資化試験の結果．

	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	
N16	++	++	++		++	+	++			++		++	++		++	++	++	++		<i>Pichia kudriavzevii</i>
N19	++	++			+					++		+	+	++	++	++	++	++	++	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
C21a	++				+			++		++					++	++			++	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
C21b	++	++			+															<i>Pichia kluyveri</i>
C30b	++																			<i>Pichia kudriavzevii</i>
S5	++		++										++							<i>Hanseniaspora uvarum</i>
S30	++				+			++		+					++	++	+	+	+	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
株名 K13	++											++								<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
K14a	++												++							<i>Pichia kudriavzevii</i>
K14b	++	+			+							+								<i>Hanseniaspora thailandica</i>
K16a	++	+	++		+	+	+	++	+	++	++	+	+	+	++	++	+	+	++	<i>Pichia kudriavzevii</i>
K20	++	+	+	+	+							++								<i>Pichia kudriavzevii</i>
K25	++		+										++							<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
K26b	++												++							<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
K26c	++	++	+	+		+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	<i>Magnusiomyces suaveolens</i>

左に株名、右に相同性の高かった属種名を示した．++：強く生育、+：生育あり

GLU：Glucose, GLY：Glycerol, 2KG：Calcium 2-keto-gluconate, ARA：Arabinose, XYL：Xylose, ADO：Adonitol, XLT：Xylitol, GAL：Galactose, INO：Inositol, SOR：Sorbitol, MDG：Methyl- α -glucopyranoside, NAG：N-Acetyl-glucosamine, CEL：Cellobiose, LAC：Lactose, MAL：Maltose, SAC：Saccharose, TRE：Trehalose, MLZ：Melezitose, RAF：Raffinose

懸念されるが、今回単離した株では、その可能性は低いと考えた¹⁶⁾。

炭酸ガス生成の確認では、30株で高い炭酸ガス生成能が観察された。

3.2.2 糖耐性、アルコール耐性及び糖資化性の観察

糖類の資化性を主に酒類、食品発酵に利用できる可能性の高い15株に対して行った。その結果、酒類や生地発酵に一般的に用いられる *S. cerevisiae* である N19 株、C21a 株および S30 株の3株は幅広い種類の糖に対して資化性を示した(表1)。また、マルトースやスクロースで生育と増殖が確認できる菌株もあった。マルトースはビール製造の原料であるため、マルトース資化性を示す酵母はビール製造にも使用できる可能性が、またスクロースに資化性を示す酵母は生地発酵などにも利用できる可能性がある。

糖耐性、エタノール耐性試験を N19 株、C21a 株および S30 株の3株に対して行った結果、3株とも5%、10%のグルコース濃度で、また S30 株は5%、10%エタノール濃度の培地中で生育することが可能であった。酒類の製造の際には発酵初期に高濃度の原料溶液に、発酵後期は自らが生成した高濃度のエタノールにさらされるため、糖耐性やエタノール耐性が不可欠であるが、これらの3株、特に S30 株は酒造適性を有すると考えた。

3.2.3 清酒小仕込み試験

N19 株、C21a 株および S30 株の3株の醸造特性を対照区である MK1 株と比較した結果(図2、表2)、C21a 株と S30 株は MK1 株と同程度の炭酸ガス減量とアルコール生成能を示し、実用的な発酵能力を有していた。しかし、日本酒度の値は低く、残存グルコースの値は高いので、MK1 株に比べて糖の消費が弱く、甘味を残す酒質となる可能性がある。一方、N19 株はアルコール生成能が著しく低く、酸度とアミノ酸度は高いことから、清酒醸

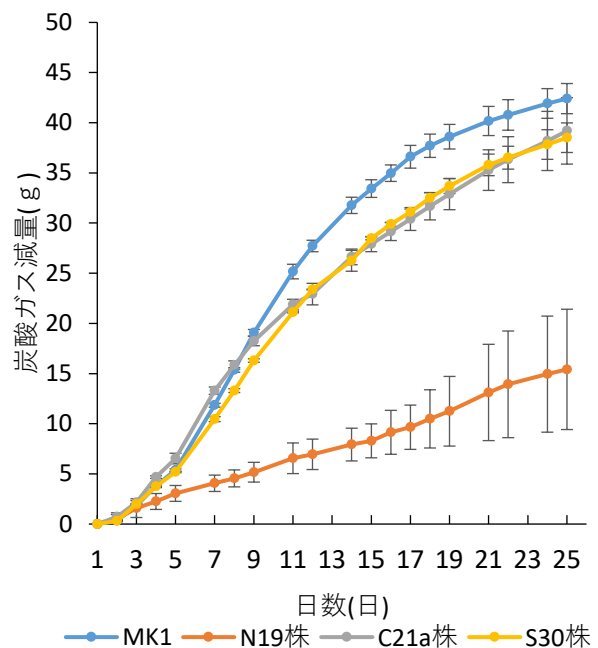


図2 清酒小仕込みの炭酸ガス減量の経過

表2 製成酒の成分分析の結果

		MK1	N19株	C21a株	S30株
(成分値)	アルコール (%)	18.7 ^a	2.2 ^b	16.8 ^a	17.8 ^a
	日本酒度 (-)	4.9 ^a	-134.2 ^d	-10.2 ^c	-2.3 ^b
	pH (-)	4.5 ^a	4.0 ^c	4.2 ^b	4.4 ^a
	酸度 (mL)	3.2 ^c	6.3 ^a	4.2 ^b	3.4 ^c
	アミノ酸度 (mL)	2.2 ^b	2.6 ^a	1.9 ^d	2.0 ^c
	グルコース (%)	2.2 ^c	19.3 ^a	3.4 ^b	3.0 ^b
(有機酸組成)	リン酸 (ppm)	566.1 ^a	400.9 ^b	566.8 ^a	586.7 ^a
	クエン酸 (ppm)	88.3 ^c	381.7 ^a	134.0 ^b	135.2 ^b
	リンゴ酸 (ppm)	178.6 ^b	154.3 ^b	231.8 ^a	181.4 ^b
	コハク酸 (ppm)	920.7 ^a	197.2 ^c	791.1 ^b	739.2 ^b
	乳酸 (ppm)	1291.3 ^{ab}	686.9 ^c	1493.3 ^a	1120.0 ^b
	酢酸 (ppm)	327.3 ^c	1438.8 ^a	830.5 ^b	471.3 ^c
(香気成分組成)	酢酸エチル (ppm)	147.5 ^a	6.1 ^b	139.9 ^a	156.5 ^a
	酢酸イソアミル (ppm)	3.2 ^{ab}	3.6 ^a	0.8 ^c	2.1 ^b
	カプロン酸エチル (ppm)	0.67 ^a	0.09 ^c	0.41 ^b	0.33 ^b
	イソアミルアルコール (ppm)	151.7 ^a	25.5 ^c	201.1 ^b	203.4 ^b

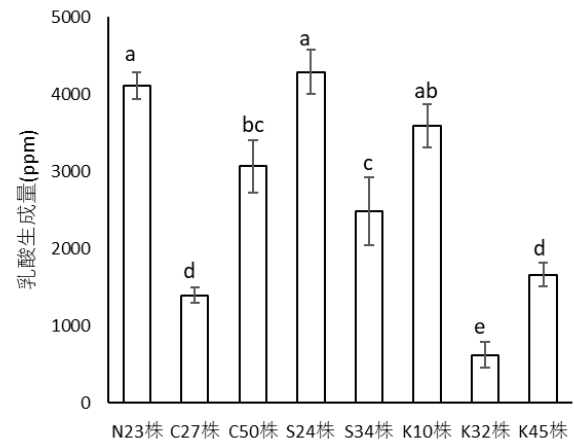
異なる文字は有意差を示す($p < 0.05$).

造適性は低いと判断した。酸組成からは、S30 株は MK1 株と同様の値を示し類似した代謝特性を有する一方で、C21a 株はリンゴ酸や乳酸が多く、酸味が特徴的な傾向になると考えられた。N19 株は酢酸濃度およびクエン酸濃度が高く、コハク酸濃度や乳酸濃度が低いなど、他株とは大きく異なる有機酸組成を示した。

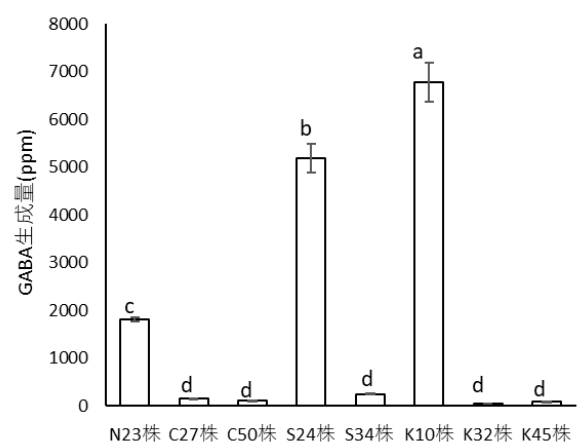
香気成分においては、C21a 株と S30 株の酢酸イソアミルとカプロン酸の値は MK1 株と比較して低くなった。酢酸イソアミルに関しては、MK1 株よりも N19 株では高く、C21a 株では低くなったが、いずれも酢酸イソアミルの濃度としては一般的な値であり、良好な香気成分を生産する株であると判断した¹⁷⁾。一方、N19 株は一定のエステル生成能は認められるが、発酵能は低いため、清酒醸造適性は低いと考えた。以上より、C21a 株および S30 株は MK1 と同等の発酵性能を有する一方、N19 株は清酒醸造には適さない株であると判断した。

3.3 乳酸菌のスキムミルク凝乳試験、乳酸生成測定及び GABA 生成測定

凝乳試験に供した 41 株のうち 27 株で凝固が確認された。このうち食品利用が期待される N23 株、C27 株、C50 株、S24 株、S34 株、K10 株、K32 株および K45 株の 8 株については、酸度、乳酸生成能および GABA 生成能を評価した。N23 株、C27 株、C50 株および S34 株は凝固と赤色呈色を示し、酸度および乳酸生成量が高い株であった（図 3a、表 3）。一方、S24 株および K10 株は酸度および乳酸生成量が高いものの、タンパク質分解による



a) 乳酸生成量



b) GABA 生成量

図 3 乳酸生成量(a)と GABA 生成量(b)のグラフ
(異なる文字は有意差を示す($p<0.05$))

表 3 乳酸菌株の各実験の結果

株名	属種名	凝乳性	呈色	pH (-)	酸度 (mL)	乳酸生成量 (ppm)	GABA生成量 (mg/mL)
N23	<i>Lactococcus lactis</i>	++	赤	4.64 ^g	6.9 ^a	4111.7 ^a	1817.3 ^c
C27	<i>Lactococcus lactis</i>	+	赤	5.02 ^d	5.2 ^{bc}	1394.2 ^d	162.6 ^d
C50	<i>Enterococcus faecium</i>	++	赤	5.18 ^c	5.0 ^c	3062.9 ^{bc}	115.4 ^d
S24	<i>Lactobacillus brevis</i>	—	青	4.75 ^f	6.5 ^a	4289.2 ^a	5179.0 ^b
S34	<i>Enterococcus faecium</i>	+	赤	5.10 ^c	5.5 ^b	2480.0 ^c	252.0 ^d
K10	<i>Lactobacillus brevis</i>	—	青	4.88 ^e	6.7 ^a	3586.7 ^{ab}	6777.4 ^a
K32	<i>Enterococcus faecium</i>	—	赤	5.48 ^a	3.3 ^e	620.0 ^e	57.6 ^d
K45	<i>Enterococcus faecium</i>	—	赤	5.34 ^b	4.5 ^d	1660.0 ^d	86.5 ^d

++：強く凝固，＋：凝固，－：凝固なし。異なる文字は有意差を示す($p<0.05$)。

液化の影響で凝固せず、分解物の影響により赤色への呈色が弱くなった可能性がある¹⁸⁾。K32株およびK45株は凝固を示さず、酸度および乳酸生成量も低かった。N23株、C50株およびS24株は高い乳酸生成能を有し、特にN23株およびC50株は乳製品発酵への適性が高いと考えられた。

GABA生成量ではK10株が最も高く、S24株とN23株も高い値を示した(図3b, 表3)。GABAは血圧低下やリラックス効果などの機能性が知られ、一定量の摂取で機能性が期待される成分であることから、これらの株は食品への機能性付与に有用と考えられる^{9, 19, 20)}。GABAの有効摂取量は数mgから50mg程度が一つの目安とされているが、この3株は食品中に十分な量のGABAを付与できる可能性が高いと考えられた^{9, 19, 20)}。S24株は酸生成能とGABA生成能の両方を有することから発酵乳製品や機能性食品への応用が期待される。K10株はGABA生成能が高い一方で凝固性を示さないため発酵飲料などへの応用が適すると考えられる。

また、S24株およびK10株はGABA高生産で知られる*L. brevis*に属し、本試験でも高い生成能が確認された。一方、同じ*L. lactis*に属するN23株とC27株の間でGABA生成量に差が認められ、同種内においても株間で差が存在することが示された。

4. 結論

本研究では、三重県内の多様な環境から酵母54株および乳酸菌44株を同定し、それらの生理学的特性および食品への応用可能性について検討した。

酵母については、産膜性や代謝活性などの評価により、酒類製造に不適な株と有望株の選別が可能であった。特に、C21a株とS30株は清酒小仕込み試験において三重県清酒酵母MK1と同等の発酵能および吟醸化香生成能を示し、酒類醸造への応用が期待される一方、N19株は発酵能が低く清酒醸造に適しないことが明らかとなった。

乳酸菌については、凝乳性および乳酸生成能から、N23株とC50株が乳製品発酵に適した株であると考えられた。また、GABA生成能の評価からは、K10株、S24株およびN23株が高い機能性成分生産能を有することが示され、特にS24株は発

酵能と機能性の両面で有望であった。さらに、同種内においてもGABA生成能に差が認められ、株レベルでの特性評価の重要性が示唆された。

以上より、本研究で単離した微生物の中には、酒類醸造や発酵食品、機能性食品への応用が期待される有用株が複数存在することが明らかとなった。本研究の成果は、三重県における微生物多様性の理解を深めるとともに、有用微生物資源の蓄積および地域発の食品開発に資する基盤となることが期待される。

謝辞

本研究は、岡三加藤文化振興財団の助成により実施されました。また、環境サンプルの採取地について、松阪市産業支援センターに松阪市内の綿花圃場を3地点ご紹介頂きました。付記して謝意を表します。

参考文献

- 1) Masako Takashima *et al.* : “Taxonomic Richness of Yeasts in Japan within Subtropical and Cool Temperate Areas”, PLOS ONE, 7, e50784, (2012)
- 2) 環境省 : “生物多様性国家戦略 2012-2020～豊かな自然共生社会の実現に向けたロードマップ～”. 環境省, p212-217 (2012)
- 3) 三井 俊ほか : “芙蓉の花から分離した酵母の清酒醸造特性評価”. あいち産業科学技術総合センター研究報告, 6, p58-61 (2017)
- 4) 久松賢太郎ほか : “岐阜県内から採取された酵母のビール醸造評価”. 岐阜県食品科学研究所研究報告, 4, p9-10 (2023)
- 5) 静岡県工業技術研究所沼津工業技術支援センターバイオ科 : “海洋由来乳酸菌を用いた豆乳ヨーグルトの開発!” 生物工学会誌, 100, p388-389 (2022)
- 6) 鈴木成宗ほか : “樹液から単離した香気生産野生酵母のビール香気特性および実用性の評価”. 日本食品工学会誌, 17, p59-60 (2016)
- 7) 中村昌弘ほか : “単離・同定された天然酵母の中華まん用酵母としての特性について”. 日本食品工学会誌, 24, p69-75 (2023)
- 8) 濱岡直裕ほか : “ヨーグルト製造用途乳酸菌の効率的な評価選抜スキームの構築”. 北海道

- 立総合研究機構食品加工研究センター研究報告, 15, p11-20 (2020)
- 9) 侯 歌川ほか：“ γ -アミノ酪酸 (GABA) を高生産する乳酸菌の選抜と鶏肉発酵調味液の GABA 富化”. 日本食品科学工学会誌, 60, p125-132 (2013)
- 10) 藤野瞬一ら：“出羽三山植物体からのアルコール発酵能を有する野生酵母の単離”. 日本醸造協会誌, 111, p743-749 (2016)
- 11) 児玉健太郎ら：“海洋酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の分離と利用”. 日本醸造協会誌, 94, p879-883 (2016)
- 12) 古川敏郎ら：“清酒醸造の微生物学的管理(第4報)”. 日本農芸化学会誌, 37, p533-538 (1963)
- 13) 丸山慎裕ほか：“三重県清酒酵母の遺伝的及び醸造特性の包括的評価”. 日本醸造協会誌, 118, p115-127 (2023)
- 14) 日本醸造協会：“第四回改訂国税庁所定分析法注解”. 日本醸造協会, p7-33 (1993)
- 15) 吉田宣政ほか：“整腸剤に含まれる腸球菌は *Enterococcus faecalis* ではなく *Enterococcus faecium* である”. 医療薬学, 47, p38-42 (2021)
- 16) 後藤邦康：“酵母の染色体上のキラー”. 日本醸造協会誌, 89, p18-25 (1994)
- 17) 独立行政法人酒類総合研究所：“令和5酒造年度全国新酒鑑評会出品酒の分析について”. 独立行政法人酒類総合研究所, 197, p1-17 (2025)
- 18) 岡田早苗：“乳酸菌世界の新規な研究資源開発を-古典的かつ重要な研究の進め方-”. 日本乳酸菌学会誌, 35, p8-14 (2024)
- 19) 土田 隆ほか：“血圧が高めの健常者および軽症高血圧者に対する γ -アミノ酪酸高含有クロレラの効果”. 日本栄養・食糧学会誌, 56, p97-102 (2003)
- 20) Tsutomu Kanehira *et al.*：“Relieving Occupational Fatigue by Consumption of a Beverage Containing γ -Amino Butyric Acid”. J. nutr. sci. vitaminol, 57, p9-15 (2011)